Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 15, No. 5, Dec- Jan 2020, p. 583-596

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 15، شماره 5، آذر - دی 1398، ص.596-583

بهینه‌سازی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و تغذیه‌ای پروتئین نخود کاجان (*Cajanus cajan*) طی هیدرولیز با آنزیم پپسین به کمک روش سطح پاسخ

الهام رنجبر ندامانی[1]- علیرضا صادقی ماهونک[2*]- محمد قربانی[2]- شارلوت جاکوبسن[3]- وحید خوری[4]

تاریخ دریافت: 1397/09/14
تاریخ پذیرش: 1398/02/11

چکیده

در این پژوهش، از روش سطح پاسخ برای بهینه‌سازی و مدلسازی شرایط هیدرولیز پروتئین‌های نخود کاجان (*Cajanus cajan*) (لپه) توسط پپسین و تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و تغذیه‌ای استفاده شد. هیدرولیز در نسبت آنزیم به سوبسترا 1، 2 و 3 درصد(وزنی- وزنی)، دماهای 30، 35 و 40 درجه سانتی‌گراد و زمان‌های 2، 3/5 و 5 ساعت انجام، و توانایی مهار رادیکال آزاد 2و2 دی فنیل 1 پیکریل هیدرازیل، قدرت احیاءکنندگی، مهار رادیکال هیدروکسیل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به‌عنوان متغیرهای وابسته بررسی شد. شرایط بهینه هیدرولیز برای دستیابی به بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، نسبت آنزیم به سوبسترا 2/15 درصد، دمای 39/9 درجه سانتی‌گراد و زمان 4/52 ساعت بود. پروتئین هیدرولیز شده دارای مقادیر زیادی از آمینواسیدهای آنتی‌اکسیدان گلوتامیک اسید و فنیل آلانین بود و از نظر وجود آمینواسیدهای ضروری دارای کیفیت تغذیه‌ای مناسبی بود. نتایج بررسی توزیع وزن مولکولی (به روش FPLC) نشان داد که وزن مولکولی بیشتر پپتیدهای تولید شده کمتر از 10 کیلودالتون است که بیشترین تأثیر را در فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند. نتایج نشان داد که از پروتئین‌های هیدرولیز شده نخود کاجان توسط پپسین می‌توان به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی و همچنین به‌عنوان منبع آمینواسیدهای ضروری استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین هیدرولیز شده، پپسین، آنتی‌اکسیدان، *Cajanus cajan*، پپتیدهای زیست‌فعال

مقدمه

تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و زیست‌فعالی از منابع گوناگون به‌طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته است (Li *et al*.,2017؛ Zheng *et al*., 2017؛ Lacroix *et al*., 2017؛ Park *et al*., 2016). یکی از روش‌های تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده استفاده از آنزیم‌های پروتئولیتیک است، که واکنش تجزیه پروتئین را در شرایط ملایم‌تر و قابل کنترل‌تر انجام می‌دهند. میزان فعالیت این آنزیم‌ها به غلظت آنزیم، مقدار آنزیم، pH، دما و سوبسترا وابسته است (Rakte and Nanjwade, 2014)، درنتیجه بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز می‌تواند به تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده با ویژگی‌های زیستی و عملکردی بهتر کمک کند.

پپسین یک آسپارتیک اندوپپتیداز از خانواده آنزیم‌های گوارشی با عملکرد اختصاصی گسترده است که پیوندهای پپتیدی را ترجیحاً در محل آمینواسیدهای آبگریز و آروماتیک می‌شکنند. این آنزیم اساساً برای هیدرولیز غیراختصاصی پروتئین‌ها و پپتیدها در محیط اسیدی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Jurado *et al*., 2012).

نخود کاجان (*Cajanus cajan*) از حبوبات چندساله زیرخانواده Papilionoideae است که بیشتر در کشورهای مناطق استوایی نیمه خشک پرورش داده می‌شود (Nix *et al*., 2015). در ایران این محصول در آذرشهر استان آذربایجان شرقی کشت می‌شود و از آن لپه تهیه می‌شود. کمبود پروتئین در رژیم‌غذایی افراد بسیار رایج است. در صورت دشواری دسترسی به منابع حیوانی، پروتئین‌های گیاهی منبع اصلی تأمین پروتئین برای انسان‌ها هستند. در بین این پروتئین‌ها، نخود کاجان که دارای حدود 25% پروتئین در دانه است، یک غله

1 و 2- به‌ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار، گروه شیمی مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
3- استاد، گروه بیواکتیو، دانشگاه صنعتی دانمارک.
4- دانشیار، گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی گرگان.
(*- نویسنده مسئول: Email: sadeghiaz@yahoo.com)
DOI: 10.22067/ifstrj.v15i4.76968

بسیار مهم بوده و رتبه ششم را در بین غلات تولید شده در جهان دارد و در نتیجه یکی از منابع اصلی رژیم غذایی مردم جهان است (Nix *et al*., 2015). این دانه سرشار از نشاسته، پروتئین، کلسیم، منیزیم، فیبرخام، چربی و عناصر جزئی و مواد معدنی است. جدا از ارزش تغذیه‌ای زیاد، این دانه به عنوان یک داروی سنتی در چین، فیلیپین و برخی از کشورهای دیگر مورد استفاده قرار می‌گیرد. تحقیقات پزشکی بر روی این گیاه نشان می‌دهد که نخود کاجان توانایی درمان انواع بیماری‌های انسان از جمله برونشیت، سرفه، ذات الریه، عفونت تنفسی، اسهال خونی، اختلالات قاعدگی، زخم، تومورهای شکمی، دندان‌درد و دیابت را دارد (Saxena *et al*., 2010). مقادیر اسیدهای آمینه آبگریز در این دانه زیاد است؛ از این رو انتظار می‌رود این گیاه منبع مناسبی برای تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده باشد (Solomon et al., 2016).

اکسیداسیون لیپیدها در مواد غذایی یکی از عوامل اصلی مؤثر بر کیفیت نهایی محصول مانند طعم و بو، رنگ، بافت و ارزش تغذیه‌ای است (Pereira *et al*., 2017) و از این‌رو در سال‌های اخیر، جلوگیری از واکنش‌های اکسیداسیونی به یک چالش عمده تبدیل شده است (Ghnimi *et al*., 2017).

روش سطح پاسخ[1] (RSM) یک تکنیک محاسباتی پیچیده برای بهینه‌سازی فرآیند است. این روش از داده‌های ورودی حاصل از آزمایشات برای دستیابی به یک سری معادلات بهره می‌برد و طرح آزمایشی مناسبی تولید می‌کند که دربرگیرنده تمامی متغیرهای مستقل است. در روش RSM تنها زمان کوتاهی برای ارزیابی تمام متغیرها لازم است و در نتیجه کار آزمایشگاهی از نظر زمانی نیز بهینه سازی می‌شود (Khairul Anwar and Mohamed Afzil, 2015).

با وجود تمامی ویژگی‌های مثبت پروتئین‌های نخود کاجان (لپه)، مطالعات مربوط به نخود کاجان بیشتر پیرامون مقدار و کیفیت پروتئین‌های آن و معرفی این محصول به‌عنوان منبع پروتئینی غنی و مناسب بوده است و بررسی ویژگی‌های پروتئین هیدرولیز شده آن به تازگی و همزمان با انجام این پژوهش مورد توجه قرار گرفته است (Olagunju et al., 2018). درنتیجه هدف از مطالعه حاضر بررسی شرایط بهینه هیدرولیز پروتئین‌های نخود کاجان برای دستیابی به پروتئین‌های هیدرولیز شده با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و تغذیه‌ای مناسب است، تا بتوان یک منبع آنتی‌اکسیدانی و تغذیه‌ای جدید و مناسب معرفی و علاوه بر کاربرد رایج این دانه به‌عنوان خوراک روزانه، از فواید سلامتی‌بخش ایجاد شده در اثر هیدرولیز پروتئین‌های آن نیز استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

نخود کاجان (لپه) از آذرشهر آذربایجان شرقی، ایران خریداری شد. آنزیم پپسین با فعالیت 250 واحد در میلی‌گرم از شرکت سیگما- آلدریچ و سایر مواد شیمیایی از شرکت مرک با درجه آنالیتیکی تهیه شد.

بررسی حلالیت پروتئین‌های آرد نخود کاجان در pHهای مختلف

بیشترین و کمترین میزان حلالیت پروتئین‌های نخود کاجان به روش Kinsella (1976) انجام شد. ابتدا دوازده سوسپانسیون به نسبت 1:20 (وزنی- حجمی) آرد نخود کاجان در آب مقطر تهیه شده و سوسپانسیون‌ها پس از یک ساعت مخلوط شدن در دمای محیط توسط هیدروکسید سدیم و اسید کلریدریک یک نرمال به pHهای 1 تا 12 رسانده شده و 30 دقیقه در دمای ثابت هم زده شدند. سپس به مدت 30 دقیقه در دمای محیط و 6000 دور دقیقه سانتریفوژ شدند و میزان پروتئین محلول در سوپرناتانت حاصل به روش برادفورد اندازه‌گیری شد.

استخراج پروتئین

استخراج پروتئین به روش Akintayo و همکاران (1999) انجام گرفت. ابتدا سوسپانسیون آرد نخود کاجان (10:1 وزنی/ حجمی) با pH=11 (سدیم هیدروکسید 1 نرمال، براساس نتیجه آزمون حلالیت پروتئین) تهیه شد. این سوسپانسیون به مدت یک ساعت در دمای محیط هم زده شد، یک شب در 4 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از آن به مدت 20 دقیقه با سرعت 6000 دور در دقیقه در دمای 4 درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد. pH سوپرناتانت به‌دست آمده توسط هیدروکلریک اسید 1 نرمال روی 3 تنظیم (بر اساس نتیجه آزمون حلالیت پروتئین) و مجدداً در شرایط مشابه سانتریفوژ شد. رسوبات حاصل توسط خشک‌کن انجمادی به پودر تبدیل و تا زمان مصرف در 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تولید پروتئین هیدرولیز شده توسط پپسین

سوسپانسیون پروتئین (5% وزنی/ حجمی) با pH=2 (با استفاده از اسید کلریدریک 1 نرمال) تهیه شد. پارامترهای هیدرولیز شامل نسبت

1 Response Surface Method

آنزیم به سوبسترا (1، 2 و 3 درصد وزنی- وزنی)، دما (30، 35 و 40 درجه سانتی‌گراد) و زمان (2، 3/5 و 5 ساعت) بود. واکنش هیدرولیز در شیکر اینکوباتور با سرعت 200 دور در دقیقه انجام گرفت. واکنش هیدرولیز توسط قرار دادن نمونه‌ها در حمام آب با دمای 85 درجه سانتیگراد به مدت 10 دقیقه پایان یافت. سوسپانسیون به مدت 20 دقیقه با سرعت 6000 دور در دقیقه و در دمای محیط سانتریفوژ شد. سوپرناتانت حاصل برای انجام آزمایشات بعدی جمع‌آوری گردید (Meshginfar *et al*., 2014).

بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز به روش سطح پاسخ (RSM)

از روش RSM برای بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز و پیش‌بینی پاسخ‌های مورد مطالعه استفاده شد. طرح مرکب مرکزی (CCD) با 6 تکرار در نقطه مرکزی با 20 تیمار برای ساخت مدل مورد استفاده قرار گرفت. متغیرهای مستقل شامل نسبت آنزیم به سوبسترا (A: درصد)، دما (B: درجه سانتی‌گراد) و زمان (C: ساعت) در سه سطح هم‌فاصله (1+، صفر، 1-) (جدول 1) بود.

جدول 1- متغیرهای مستقل و مقادیر کدگذاری شده و واقعی آنها

متغیرهای مستقل	سطوح مورد استفاده برای متغیرها		
	+1	صفر	-1
A: نسبت آنزیم به سوبسترا (٪)	3	2	1
B: دمای هیدرولیز برای آنزیم پپسین (درجه سانتی‌گراد)	40	35	30
C: زمان هیدرولیز (ساعت)	5	3/5	2

متغیرهای وابسته شامل مهار رادیکال آزاد 2 و2 دی فنیل 1 پیکیریل هیدرازیل (DPPH)، قدرت احیاءکنندگی، مهار رادیکال هیدروکسیل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بود.

آنالیز ترکیبات شیمیایی

درصدهای رطوبت، پروتئین، چربی و خاکستر (برمبنای وزن مرطوب) به روش (2005) AOAC اندازه‌گیری شد.

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

مهار رادیکال آزاد DPPH

0/1 میلی‌لیتر محلول DPPH (0/1 میلی‌مولار در اتانول 95%) با 0/1 میلی‌لیتر از محلول پروتئین هیدرولیز شده مخلوط و به مدت 60 دقیقه در تاریکی و دمای اتاق نگهداری شد. پیش از پایان زمان 60 دقیقه، نمونه‌ها برای حذف رسوبات به مدت 10 دقیقه با سرعت 5000 دور در دقیقه و دمای محیط سانتریفوژ شدند (50 دقیقه نگهداری و 10 دقیقه سانتریفوژ، مجموعاً 60 دقیقه). جذب نمونه‌ها در 517 نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده و درصد مهار رادیکال آزاد DPPH به‌صورت معادله (1) محاسبه شد (Farvin *et al*., 2014):

(1) مهار رادیکال آزاد DPPH (٪) = (جذب نمونه- جذب شاهد)/ جذب شاهد ×100

قدرت احیاءکنندگی

هدف از این آزمون برای بررسی قدرت احیاء اتم آهن (III) توسط پروتئین‌های هیدرولیز شده بود. 1 میلی‌لیتر از محلول هیدرولیز شده با 2/5 میلی‌لیتر بافر فسفات (0/2 مولار، pH 6/6) و 2/5 میلی‌لیتر پتاسیم فری سیانید ترکیب شد و به مدت 30 دقیقه در 50 درجه سانتیگراد حرارت دید. 2/5 میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید اضافه و به مدت 10 دقیقه در 6000 دور در دقیقه سانتریفوژ شد. در نهایت 2/5 میلی‌لیتر از محلول سطحی با 2/5 میلی‌لیتر آب مقطر و 0/5 میلی‌لیتر کلرید آهن ترکیب و جذب نمونه‌ها در 700 نانومتر اندازه‌گیری شد. جذب بیشتر نشانگر قدرت احیاءکنندگی بیشتر بود (Yildirim *et al*., 2001).

مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل

1 میلی‌لیتر از محلول 1/865 میلی‌مولار 1، 10- فنانترولین به 2 میلی‌لیتر نمونه اضافه و مخلوط گردید. 1 میلی‌لیتر از محلول 1/865 میلی‌مولار سولفات آهن (FeSO4.7H2O) به این مخلوط اضافه شد. واکنش با افزودن 1 میلی‌لیتر H_2O_2 (0/03% حجمی- حجمی) آغاز گشت. پس از 60 دقیقه اینکوباسیون در حمام آب 37 درجه، جذب نمونه‌ها در 536 نانومتر خوانده شد. محلول واکنش بدون حضور نمونه به‌عنوان کنترل منفی و محلول واکنش بدون حضور نمونه و H_2O_2 به‌عنوان شاهد انتخاب شد. درصد مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل به روش معادله (2) محاسبه گردید (Chi *et al*., 2015):

(2) 100× (جذب کنترل منفی- جذب شاهد)/ (جذب کنترل منفی- جذب نمونه)= (٪) مهار رادیکال هیدروکسیل

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

0/1 میلی‌لیتر محلول نمونه با 1 میلی‌لیتر محلول معرف (سولفوریک اسید 0/6 مولار، سدیم فسفات 28 میلی‌مولار و آمونیوم مولیبدات 4 میلی‌مولار) ترکیب شد و به مدت 90 دقیقه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. جذب نمونه‌ها پس از سردشدن در 695 نانومتر اندازه‌گیری شد. جذب بیشتر نشان‌دهنده ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بیشتر است (Umayaparvathi *et al.*, 2014).

آنالیز آمینواسید

بررسی ترکیب آمینواسیدی کنسانتره پروتئین و پروتئین‌های هیدرولیز شده پس از هیدرولیز کامل و مشتق‌سازی با استفاده از کیت EZ:faast Amino Acid Kit (فنامکس، تورنس، آمریکا) توسط HPLC-MS انجام شد. آزادسازی آمینواسیدها در سیستم تهیه نمونه مایکروویو (مالتیویو 3000، آنتون پار، اتریش) توسط هیدرولیز با هیدروکلریک اسید 6 مولار به مدت 1 ساعت در 110 درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. نمونه‌های هیدرولیز شده خنثی سازی و توسط جاذب استخراج فاز جامد خالص سازی و پیش از تزریق به HPLC-MS مشتق‌سازی شدند. برای این آزمون سیستم HPLC-M شامل Agilent HPLC 1100 (سانتا کلارا، آمریکا) و Agilent Ion Trap MS مورد استفاده قرار گرفت. جداسازی آمینواسیدها در 35 درجه سانتی‌گراد بر روی یک ستون Zebron ZB-AAA با ابعاد 250×3/0 میلی‌متر (فنامکس، تورنس، آمریکا) با گرادیان 83-68% فورات آمونیوم 10 میلی‌مولار در متانول و فورات آمونیوم 10 میلی‌مولار در آب با شدت جریان 0/5 میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده شد. یونیزاسیون مثبت با استفاده از APCL (450 درجه سانتی‌گراد) ایجاد شد. ترکیبات توسط مقایسه با زمان ماندگاری و طیف جرمی مخلوط استاندارد خارجی شناسایی گشتند. به‌منظور کمّی‌سازی، منحنی‌های کالیبراسیون تهیه شده و توسط HPLC-MS در شرایط مشابه نمونه‌ها مورد آنالیز قرار گرفتند.

محاسبه امتیاز شیمیایی

این امتیاز براساس پروفایل آمینواسیدهای ضروری (گرم/100 گرم) در یک پروتئین استاندارد که توسط FAO (2011) ارائه شده، به صورت معادله (3) محاسبه می‌شود (Raftani-Amiri et al., 2016):

(3) آمینواسیدهای ضروری در پروتئین استاندارد/ آمینواسیدهای ضروری در پروتئین مورد آزمایش= امتیاز شیمیایی

بررسی توزیع وزن مولکولی به روش FPLC

برای بررسی توزیع وزن مولکولی، از کروماتوگرافی Size exclusion (SEC) با سیستم FPLC ÄTA (آمسterdam بیوساینس، سوئد) و ستون Superdex Peptide 10/300GL (جی ای هلثکیر، سوئد) استفاده شد. دمای ستون 25 درجه سانتی‌گراد بود و بافر استات آمونیوم با pH=8 به عنوان فاز متحرک انتخاب گردید. برای هر کدام از نمونه‌های کنسانتره پروتئین و پروتئین هیدرولیز شده با پپسین، 100 میکرولیتر نمونه (5 میلی‌گرم برمیلی‌لیتر، که از فیلتر 0/2 میکرومتری عبور داده شده بود) به سیستم تزریق گشت و با سرعت 0/25 میلی‌لیتر بر دقیقه جریان یافت. جذب فرکشن‌ها توسط سیستم در طول موج280 نانومتر اندازه‌گیری شد. سیتوکروم c (12/3 کیلودالتون)، آپروتینین (6/5 کیلودالتون)، گلایسین 3 (189 دالتون) و گلایسین (75 دالتون) به‌عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفتند (Gringer *et al.*, 2016).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

برای آنالیز آماری به روش سطح پاسخ از نرم‌افزار Design Expert (نگارش 6,0,2) استفاده شد وآنالیز آماری مدل‌ها و آنالیز واریانس (ANOVA) توسط این نرم‌افزار انجام گرفت. سایر آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد و داده‌ها به صورت میانگین± انحراف معیار گزارش شد.

نتایج و بحث

بررسی حلالیت پروتئین‌های آرد نخود کاجان در pHهای مختلف

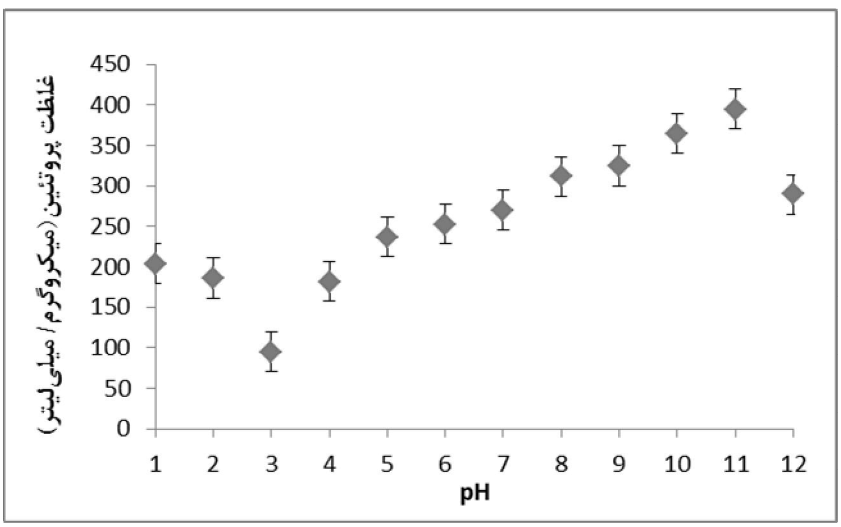
برای انجام فرآیند استخراج پروتئین لازم بود تا pHهایی که در آن پروتئین‌های نخود کاجان دارای بیشترین و کمترین میزان حلالیت هستند مشخص شود. به این منظور مقدار پروتئین‌های استخراج شده در دامنه pH بین 1 تا 12 به روش برادفورد اندازه‌گیری شد. همان‌گونه که در شکل 1 مشاهده می‌شود، کمترین میزان حلالیت پروتئین‌های نخود کاجان در pH= 3 یعنی در نقطه ایزوالکتریک آنها بود که در آن بار خالص پروتئین‌ها صفر است و جاذبه الکترواستاتیک

غلبه دارد و این امر منجر به تجمع و رسوب پروتئین می‌شود. اما بیشترین حلالیت پروتئین‌های نخود کاجان در pH= 11 بود که بار کلی پروتئین‌ها در این نقطه منفی است و به علت دافعه الکترواستاتیک، حلالیت افزایش می‌یابد (Adebowale & Lawal, 2004). استفاده از این pHها منجر به افزایش راندمان استخراج پروتئین شد.

آنالیز ترکیبات شیمیایی

مقدار پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر آرد نخود کاجان، کنسانتره و پروتئین هیدرولیز شده در جدول 2 آمده است.

آرد نخود کاجان دارای مقادیر قابل توجهی پروتئین (حدود 25% وزن دانه) است که آن را به یک منبع غذایی بسیار مناسب تبدیل می‌کند. درصد پروتئین در کنسانتره 73/85 بود که در مقایسه با مقدار پروتئین موجود در آرد نخود کاجان نشان‌دهنده فرآیند استخراج مناسب است. راندمان استخراج پروتئین از آرد نخود کاجان 25 درصد بود که درصد استخراج قابل توجهی است. کم بودن مقدار چربی موجود در آرد نخود کاجان (4/21±0/1%) به‌عنوان یک نکته مثبت تلقی می‌شود، زیرا مرحله چربی‌زدایی حذف شده و علاوه بر کاهش مراحل تولید پروتئین هیدرولیز شده، از کاربرد حلال‌های سمی مانند هگزان جلوگیری شده است. این مقدار چربی طی مراحل استخراج پروتئین و هیدرولیز کاهش یافت که به دلیل حذف ترکیبات چرب به همراه پروتئین‌های نامحلول طی سانتریفوژ یا به صورت یک لایه چربی روی سوپرناتانت بود. این امر می‌تواند باعث افزایش پایداری اکسیداتیو در کنسانتره پروتئین و پروتئین هیدرولیز شده شود (Ovissipour *et al*., 2010).



شکل 1- حلالیت پروتئین‌های نخود کاجان در برابر pH

جدول 2- خصوصیات شیمیایی آرد نخود کاجان، کنسانتره و پروتئین هیدرولیز شده

نام نمونه	پروتئین (٪)	چربی (٪)	رطوبت (٪)	خاکستر (٪)
آرد نخود کاجان	21/45±3/2	4/21±0/1	11/35±0/1	2/60±0/0
کنسانتره پروتئین	73/85±2/8	1/87±0/2	5/24±0/1	0/94±0/1
پروتئین هیدرولیز شده	87/30±4/1	0/48±0/1	2/05±0/0	4/69±0/2

*اختلاف مشاهده شده مقادیر هر ستون معنی‌دار بود ($p<0/05$).

افزایش درصد پروتئین در پروتئین هیدرولیز شده (87/30±4/1%) به دلیل افزایش حلالیت پروتئین‌ها طی هیدرولیز و حذف سایر ترکیبات توسط سانتریفوژ است. افزایش مشاهده شده در درصد خاکستر پروتئین هیدرولیز شده (4/69±0/2) به دلیل افزودن اسید (هیدروکلریک اسید) برای تنظیم pH طی فرآیند هیدرولیز است (Halim and Sarbon, 2017). کاهش میزان رطوبت پروتئین

هیدرولیز شده (0/0±2/05%) به دلیل استفاده از فرآیند خشک کردن انجمادی برای حذف آب است. نتایج به‌دست آمده مشابه نتایج Ovissipour و همکاران (2010) و Sarbon و Halim (2017) است.

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده

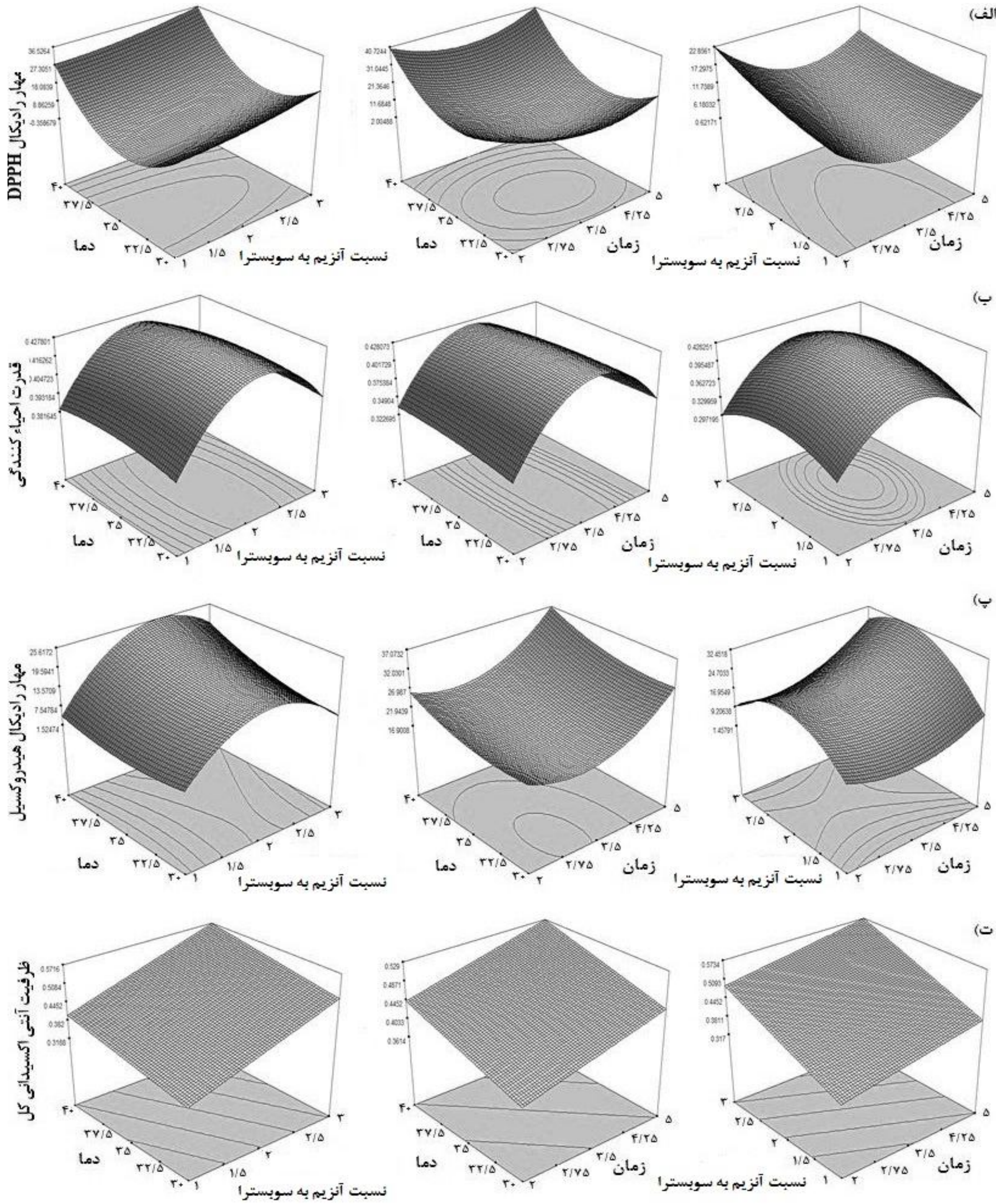
نتایج حاصل از انجام آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی برای بیست تیمار پیشنهادی توسط نرم‌افزار، در جدول 3 آمده است.

جدول 3- آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده

تیمار	متغیرهای مستقل			متغیرهای وابسته			
	نسبت آنزیم به سوبسترا (%)	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (ساعت)	مهار رادیکال آزاد DPPH (%)	قدرت احیاءکنندگی (700 نانومتر)	مهار رادیکال هیدروکسیل (%)	قدرت آنتی‌اکسیدانی کل (695 نانومتر)
1	3	40	2	51/2857	0/3	20/0983	0/455
2	2	35	3/5	4/894	0/451	18/9769	0/453
3	3	40	5	42/4286	0/358	35/8959	0/632
4	1	35	3/5	2/032	0/349	5/879	0/275
5	2	35	3/5	4/521	0/534	28/4393	0/425
6	1	40	2	35/1429	0/321	9/65	0/355
7	2	30	3/5	13/8571	0/41	15/451	0/485
8	1	40	5	40/024	0/316	10/325	0/419
9	1	30	5	15/8571	0/33	9/751	0/415
10	3	30	2	35/1429	0/295	10/256	0/367
11	2	35	2	9/2857	0/319	13/7572	0/59
12	2	35	3/5	1/573	0/351	16/1041	0/292
13	2	35	3/5	1/207	0/492	18/2081	0/389
14	2	35	3/5	1/047	0/442	14/4447	0/358
15	3	35	3/5	8	0/351	5/1041	0/709
16	2	35	5	17	0/286	35/948	0/574
17	2	40	3/5	30	0/35	25/0867	0/577
18	3	30	5	28/2857	0/346	23/5838	0/458
19	1	30	2	24/4286	0/274	10/164	0/303
20	2	35	3/5	4/9647	0/467	20/3263	0/373

جدول 4- معادلات مدل ارائه شده توسط نرم‌افزار برای هرکدام از آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی

F	R^2	مدل
0/0500	0/9763	مهار رادیکال آزاد DPPH ٪=3/12+4/27A+8/63B-1/67C+1/77A2+18/69B2+9/90C2+0/051AB-2/13AC+2/06BC
0/4350	0/6056	قدرت احیاءکنندگی =0/43+6/000A-1/000B+0/013C-0/034A2-4/409B2-0/082C2-2/000AB+7/250AC-6/750BC
0/3454	0/8056	مهار رادیکال هیدروکسیل ٪=18/77+4/92A+3/19B+5/16C-12/31A2+2/47B2+7/05C2+2/76AB+3/61AC+0/44BC
0/0648	0/4059	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل =0/45+0/085A+0/041B+0/043C



شکل 2- نمودارهای سطح پاسخ الف) مهار رادیکال آزاد DPPH (٪)، ب) قدرت احیاءکنندگی (جذب در 700 نانومتر)، پ) مهار رادیکال هیدروکسیل (٪) و ت) ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در 596 نانومتر). پارامترهای مورد بررسی: نسبت آنزیم به سوبسترا (٪)، دما (درجه سانتی‌گراد) و زمان (ساعت)

میزان عدم برازش برای این چهار آزمون به‌ترتیب 0/500، 0/4350، 0/3454 و 0/0648 بود که نشان‌دهنده تناسب مدل با داده‌های آزمایشی است. در تحقیقی که توسط Meshginfar و همکاران (2014) به روش مشابه انجام گرفت، مقادیر R^2 برای آزمون مهار رادیکال DPPH بیش از 0/95 بود (0/983). مدل به‌دست آمده برای تمامی آزمون‌ها به غیر از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل از نوع درجه دو بود (جدول 4). میزان R^2 برای آزمون‌های مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاءکنندگی، مهار رادیکال هیدروکسیل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به‌ترتیب 0/9763، 0/6056، 0/8056 و 0/4059 بود که به‌جز آزمون ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، توانایی مناسب مدل را برای پیش‌بینی تأثیر شرایط هیدرولیز بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده نشان داد.

نمودارهای مربوط به آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی در شکل 2 نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود، در بخش الف، در دمای 35 درجه سانتیگراد کمترین میزان مهار رادیکال DPPH مشاهده شد و در دو سمت دامنه دمایی مورد استفاده، مهار رادیکال DPPH افزایش یافت. همچنین میزان این فعالیت در دمای 40 درجه بیشتر از دمای 30 درجه بود. با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا ، مهار رادیکال DPPH افزایش یافت. تأثیر زمان بر مهار رادیکال DPPH مشابه تأثیر دما بوده و با با نزدیک شدن به کمترین و بیشترین زمان مورد استفاده، مهار رادیکال DPPH افزایش یافت. نسبت آنزیم به سوبسترا و دما، پارامترهای دارای اثر معنی دار ($P<0/05$) بر میزان توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH بودند اما تغییر زمان تأثیر معنی‌داری نداشت ($P>0/05$). گرچه در مورد قدرت احیاءکنندگی (بخش ب)، بیشترین فعالیت پیرامون نقطه مرکزی دیده شد، اما هیچکدام از پارامترهای مورد بررسی اثر معنی‌داری بر قدرت احیاءکنندگی نداشتند ($P>0/05$). نسبت آنزیم به سوبسترا و زمان اثر معنی‌داری ($P<0/05$) بر مهار رادیکال هیدروکسیل داشته و در دو سمت دامنه زمانی، و در پیرامون نقطه مرکزی نسبت آنزیم به سوبسترا، بیشترین فعالیت مهارکنندگی مشاهده گردید (بخش پ). در بخش ت، همانگونه که مشاهده می‌شود، مدل ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل از نوع درجه یک بوده و تنها نسبت آنزیم به سوبسترا اثر معنی‌داری در این آزمون داشت ($P<0/05$). به‌طوری که با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل افزایش یافت.

در بهینه‌سازی فرآیند هیدرولیز، عوامل مختلفی به‌عنوان عوامل مؤثر برفرآیند در نظر گرفته می‌شوند. براساس نوع ماده اولیه و پارامترهای انتخابی، و همچنین نوع آزمایش مورد بررسی، نتایج نهایی و مدل ارائه شده تحت تأثیر قرار می‌گیرند. بهینه‌سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده از سبوس برنج با استفاده از آلکالاز توسط سیلپرادیت و همکاران (2010) انجام شد. در مطالعه آنها دما و نسبت آنزیم به سوبسترا تأثیر معنی‌داری بر میزان تولید پروتئین هیدرولیز شده داشتند اما اثر زمان معنی‌دار نبود. Yu و Tan (2017) هیدرولیز آنزیمی تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده آنتی اکسیدان از کبد خوک به روش اولتراسوند را بهینه سازی نمودند. در مطالعه آنها، تمام پارامترهای مورد بررسی اثر معنی‌داری بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی داشتند. شرایط بهینه برای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی شامل نسبت آنزیم به سوبسترا 1/4%، دمای 55/5 درجه سانتی‌گراد و pH اولیه 10/15 بود. در این شرایط، درجه هیدرولیز، مهار رادیکال DPPH، توانای گیرندگی یون آهن و قدرت احیاءکنندگی به‌ترتیب 24/12%، 79%، 98/18% و 0/601 واحد جذب بود. Olagunju و همکاران (2018) مقادیر فعالیت مهار رادیکال DPPH و رادیکال هیدروکسیل را برای نخود کاجان به‌ترتیب 34/42% و 8/68% گزارش نمودند که کمتر از مقادیر به‌دست آمده در مطالعه حاضر است (به‌ترتیب 58/49% و 38/2%). علت این تفاوت آشکار در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز برای رسیدن به بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی است.

بهینه‌سازی و تأیید مدل

پس از به‌دست آمدن معادلات مدل برای هر کدام از آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی، بهینه‌یابی توسط نرم‌افزار برای انتخاب شرایط بهینه هیدرولیز با بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی انجام شد. نقطه پیشنهادی توسط نرم‌افزار برای آنزیم پپسین نسبت آنزیم به سوبسترا 2/15، دمای 39/99 و زمان 4/52 ساعت بود. برای تأیید اعتبار مدل، آزمایشات جداگانه‌ای انجام شد و مقادیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌دست آمده تأییدکننده مدل بودند. جدول 5 مقادیر به‌دست آمده در بهینه‌سازی و تأیید مدل را نشان می‌دهد. همانگونه که مشاهده می‌شود، حتی در حالتی که مقادیر به‌دست آمده کمتر از مقادیر پیش‌بینی شده است، این مقدار در دامنه مقادیر به‌دست آمده برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها است. در مطالعه Halim و Sarbon (2017) نیز نتایج به‌دست آمده در برخی موارد کمتر از نتایج پیش‌بینی شده بود، اما نتیجه به‌دست آمده در دامنه نتایج حاصل در طی بهینه‌سازی بود. ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده وابسته به نوع آنزیم، شرایط هیدرولیز و منبع پروتئینی است. هیدرولیز

جزئی می‌تواند به مقدار زیادی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده را بهبود ببخشد (Jeewanthi *et al.*, 2015).

جدول 5– مقادیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی به دست آمده در بهینه سازی و تأیید مدل

آزمون	مقادیر پیش بینی شده	مقادیر به دست آمده
مهار رادیکال آزاد DPPH (%)	20/65	58/49±0/1
قدرت احیاءکنندگی (700 نانومتر)	0/38	0/31±0/2
مهار رادیکال هیدروکسیل (٪)	26/56	38/2±/01
ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (695 نانومتر)	0/52	0/63±0/1

استفاده از دماهای بالا موجب دناتوره شدن جزئی پروتئین‌ها شده و درنتیجه آنزیم به شکل راحت‌تری می‌تواند به تجزیه پیوندهای پپتیدی بپردازد. در شرایط بهینه هیدرولیز، پپتیدهایی با بهترین ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی تولید می‌شوند، اما در سایر شرایط پپتیدهایی با ویژگی‌های ضعیف‌تر ساخته می‌شوند یا اینکه پپتیدهای آنتی‌اکسیدان مجدداً تجزیه می‌شوند و درنتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاهش می‌یابد . به‌طور کلی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی وابسته به ترکیب آمینواسیدی و اندازه پپتیدها و همچنین اندازه مولکولی آمینواسیدهای موجود در ساختار آنها است (Castro and Sato, 2015). بنابراین، برای یک آنزیم خاص، آزاد شدن پپتیدهای آنتی‌اکسیدان تحت تأثیر ماتریس هیدرولیز شده و شرایط هیدرولیز است (Garcia Moreno *et al.*, 2016). کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در شرایط دمایی بهینه آنزیم می‌تواند به دلیل فعالیت بیشتر آنزیم پپسین در این دما و در نتیجه تجزیه پپتیدهای آنتی‌اکسیدان و یا تولید آمینواسیدهای آزاد باشد. آنزیم پپسین یک اندوپپتیداز است که در محل فنیل آلانین و یا لوسین، پیوندهای پپتیدی را می‌شکند. تولید پپتیدهایی با انتهای فنیل آلانین به دلیل خاصیت آبگریزی می‌توانند در ایجاد فعالیت آنتی‌اکسیدانی نقش داشته باشند. همچنین در زمان‌های کوتاه، آنزیم فرصت لازم برای هیدرولیز کافی پروتئین‌ها را ندارد. Nourmohammadi و همکاران (2017) در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی کنجاله تخم کدو، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده با پپسین را در بیشترین زمان مورد استفاده (2 ساعت) مشاهده نمودند.

آنالیز آمینواسید

ترکیب آمینواسیدی کنسانتره پروتئین و پروتئین هیدرولیز شده در جدول 6 آمده است. ترکیب آمینواسیدی نقش مهمی در ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده دارد. مقدار آمینواسیدهای آبگریز در پروتئین هیدرولیز شده 215/84 میلی‌گرم برگرم بود. وجود مقادیر مناسبی از آمینواسیدهای آبگریز موجب انحلال راحت‌تر پپتیدها در روغن و واکنش با رادیکال‌های آبگریز و اسیدهای چرب چند غیراشباع می‌شود (Yu and Tan, 2017). این ویژگی درصورت استفاده از پپتیدهای آنتی‌اکسیدان در امولسیون‌های روغن در آب اهمیت بیشتری پیدا می‌کند. مقدار آمینواسیدهای آروماتیک در پروتئین هیدرولیز شده 57/04 میلی‌گرم بر گرم بود. آمینواسیدهای آروماتیک می‌توانند با انتقال پروتون به رادیکال‌ها، آنها را پایدار ساخته و همچنین از طریق رزونانس، به پایداری خود پپتید نیز کمک کنند. هیستیدین، تیروزین، متیونین و لیزین به‌عنوان آمینواسیدهای آنتی‌اکسیدان گزارش شده‌اند (Ng *et al.*, 2013) پس از هیدرولیز، میزان هیستیدین به شکل معنی‌داری ($p<0/05$) افزایش، اما میزان تیروزین، متیونین و لیزین کاهش یافت. به علاوه آمینواسیدهای آبگریز نیز می‌توانند موجب افزایش توانایی آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده بشوند (Halim and Sarbon, 2017؛ Queiroze et al., 2017). از طرف دیگر مقدار فنیل‌آلانین که مهارکننده رادیکال‌های آزاد است (Kumar *et al.*, 2011) به شکل معنی‌داری ($p<0/05$) افزایش یافت. گلوتامیک اسید، آسپارتیک اسید و آرژنین به ترتیب بیشترین مقدار را در ساختار آمینواسیدی پروتئین هیدرولیز شده تشکیل دادند. گلوتامیک اسید یک گیرنده فلز و همچنین دهنده هیدروژن است که می‌تواند نقش مؤثری در فعالیت آنتی‌اکسیدانی داشته باشد. هیدرولیز به شکل معنی‌داری ($p<0/05$) مقدار این آمینواسید را افزایش داد. به طور کلی هیدرولیز پروتئین به شکل قابل توجهی نسبت آمینواسیدها را تغییر داد. حاصل این تغییر ساختار آمینواسیدی در نهایت به نحوی بود که فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطلوبی تولید نمود. بخشی از کاهش میزان آمینواسیدهای اندازه گیری شده را می‌توان به فرآیند آماده‌سازی پیش از اندازه‌گیری آمینواسیدها نسبت داد که اجتناب‌ناپذیر است. همچنین تغییر در مقدار آمینواسیدها و درنتیجه حضور پپتیدهایی با بار سطحی، نسبت آبدوستی به آبگریزی

و ساختار فضایی جدید در بروز فعالیت آنتی‌اکسیدانی نقش دارد (Sarmadi and Ismail, 2010).

جدول 6- پروفایل آمینواسیدی کنسانتره پروتئین و پروتئین‌های هیدرولیز شده توسط پپسین (مقادیر بر حسب میلی‌گرم/ گرم)

آمینواسید	کنسانتره پروتئین	پروتئین هیدرولیز شده	معنی‌داری	مقدار پیشنهادی †FAO	امتیاز شیمیایی کنسانتره پروتئین	امتیاز شیمیایی پروتئین هیدرولیز شده
آرژنین	73/94±13/85	58/80±0/68	*	-	-	-
سرین	25/59±4/85	29/67±1/75	ns	-	-	-
گلایسین	20/21±4/70	20/37±2/20	ns	-	-	-
ترئونین	15/87±3/59	12/31±1/20	ns	25	0/634	0/492
آلانین	21/41±2/77	21/69±0/65	ns	-	-	-
پرولین	24/41±2/86	25/56±0/70	ns	-	-	-
متیونین	9/93±0/45	4/65±0/42	*	23	0/431	0/202
آسپارتیک اسید	52/86±11/68	57/73±/40	ns	-	-	-
والین	38/92±5/23	39/55±1/75	ns	40	0/973	0/988
هیستیدین	16/02±0/87	18/23±0/38	*	16	1/001	1/139
لیزین	38/48±4/83	26/26±0/10	*	48	0/801	0/457
گلوتامیک اسید	73/18±14/32	88/07±1/66	*	-	-	-
لوسین	43/81±4/51	45/45±1/76	ns	61	0/718	0/745
فنیل آلانین	34/91±2/64	41/49±0/65	*	41	0/851	1/011
ایزولوسین	24/82±0/63	21/90±1/14	*	30	0/827	0/730
تیروزین	17/12±1/22	15/55±0/44	*	-	-	-

†مقادیر پیشنهادی برای بزرگسالان، فائو (2011)

* دارای اختلاف معنی دار ($p<0/05$)

ns بدون اختلاف معنی‌دار ($p>0/05$)

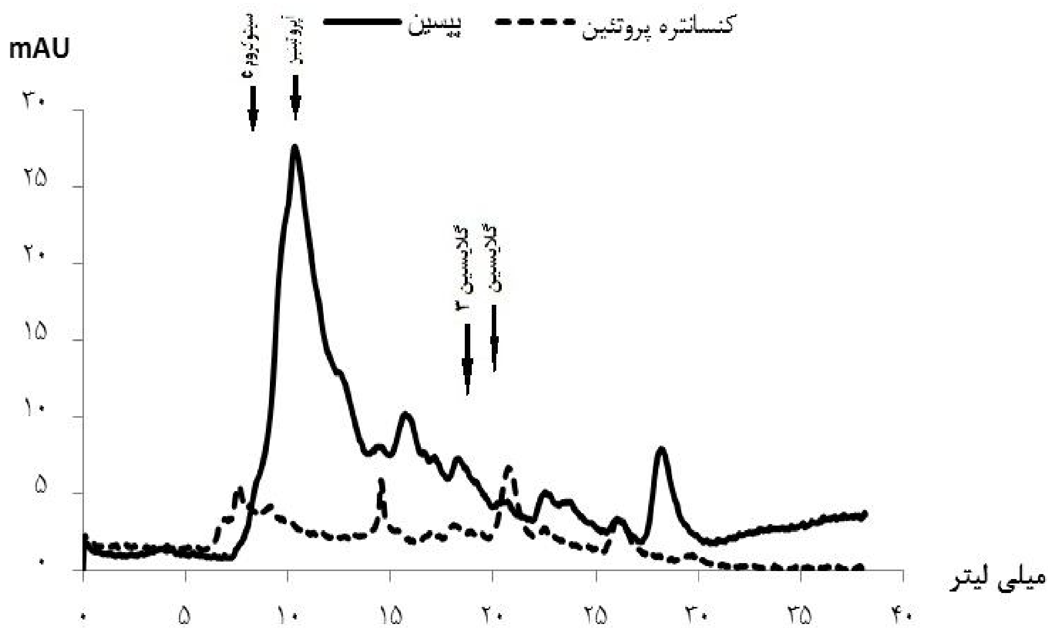
امتیاز شیمیایی برای تخمین ارزش تغذیه‌ای پروتئین مورد استفاده قرار می‌گیرد. نتایج این بررسی نشان داد که متیونین آمینواسید محدود کننده در کنسانتره پروتئین و پروتئین هیدرولیز شده است (جدول 6)، زیرا در هر دو نمونه، متیونین کمترین مقدار را دارد. هیدرولیز پروتئین با وجود ایجاد تغییر در نسبت آمینواسیدها، افزایشی در نسبت متیونین به مجموع آمینواسیدها ایجاد ننمود. درنتیجه پروتئین هیدرولیز شده نیز همانند کنسانتره پروتئین دچار کمبود متیونین است. سایر آمینواسیدها در مقادیر مناسبی قرار دارند. هیدرولیز توسط پپسین باعث افزایش معنی‌دار ($p<0/05$) میزان هیستیدین، فنیل آلانین (آمینواسیدهای ضروری) و گلوتامیک اسید (آمینواسیدهای غیرضروری) شد. در مطالعه‌ای که Raftani-Amiri و همکاران (2016) بر روی پروتئین هیدرولیزشده *Sepia pharaonis* انجام دادند، امتیاز شیمیایی آمینواسیدهای ضروری نسبت به پروتئین مرجع کاهش یافت، اما مقدار مشاهده شده را کافی ارزیابی نمودند.

بررسی توزیع وزن مولکولی به روش FPLC

شکل 3 توزیع وزن مولکولی کنسانتره پروتئین و پروتئین‌های هیدرولیز شده را در 280 نانومتر نشان می‌دهد. همانگونه که مشاهده می‌شود، مقدار پپتیدهای بزرگ و کوچک در کنسانتره پروتئین تقریباً نزدیک به هم و بسیار کم است، زیرا در فرآیند استخراج پروتئین از هیچگونه آنزیم هیدرولیزکننده‌ای استفاده نشده و مقادیر کم پپتیدهای اندازه‌گیری شده به دلیل استفاده از اسید و قلیا طی استخراج است.

استانداردهای مورد استفاده و وزن مولکولی آنها در جدول 7 آمده است. بخش عمده‌ای از پپتیدهای تولید شده در اثر استفاده از آنزیم

پپسین دارای وزن مولکولی 12/3 کیلودالتون (سیتوکروم c) تا 75 دالتون (گلایسین) بودند؛ به این معنی که بیشتر پپتیدها نسبت به پروتئین هیدرولیز شده با پپسین دارای اندازه بزرگتری بودند. همچنین بزگترین پیک در نمودار پپسین، در حجم شستشوی 11 میلی‌لیتر مشاهده شده که معادل با پپتیدهای دارای وزن مولکولی 6/5 کیلودالتون (آپروتنین) است. گسترده بودن تعداد جایگاههایی که آنزیم می‌تواند بر آنها اثر داشته باشد موجب تولید پپتیدهای متنوع از نظر اندازه می‌شود (Garcia-Moreno *et al.*, 2016).



شکل 3- کروماتوگرام کنسانتره پروتئین و پروتئین هیدرولیز شده (توسط پپسین) در 280 نانومتر

پیک‌هایی که پس از 20 میلی‌لیتر مشاهده می‌شوند، مربوط به ترکیباتی هستند که به دلیل برهم‌کنش آبگریزی و تمایل بیشتر به فاز ساکن، دیرتر از ستون خارج می‌شوند و امکان اندازه‌گیری وزن مولکولی آنها وجود ندارد (Gringer *et al.*, 2016).

پپتیدهایی با وزن مولکولی کمتر فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری دارند (Zou *et al.*, 2016) و پپتیدهایی با وزن مولکولی کمتر از 10 کیلودالتون دارای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند (Gringer *et al.*, 2016).

جدول7- استانداردهای FPLC

استاندارد	وزن مولکولی (گرم/ مول)	حجم شستشو (میلی‌لیتر)
c سیتوکروم	12384	9/9
آپروتینین	6511/44	11/8
گلایسین 3	189/17	18/4
گلایسین	75/07	19/6

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، پروتئین‌های نخود کاجان (*Cajanus cajan*) به خوبی توسط پپسین در شرایط بهینه نسبت آنزیم به سوبسترا (2/15%)، دمای (39/9 درجه سانتی‌گراد) و زمان (4/52 ساعت) هیدرولیز شدند. بر اساس آزمون‌های مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاءکنندگی، مهار رادیکال هیدروکسیل و ظرفیت

آنتی‌اکسیدانی کل، پروتئین‌های هیدرولیز شده در شرایط بهینه دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی بودند و وزن مولکولی پروتئین‌های هیدرولیز شده کمتر از 10 کیلودالتون بود که بیان‌کننده رابطه بین ساختار و فعالیت آنتی‌اکسیدانی است. پروتئین هیدرولیز شده از دیدگاه آمینواسیدی دارای کیفیت مناسبی بود. میزان آمینواسیدهای آنتی‌اکسیدان مشاهده شده نیز مؤید رابطه بین آمینواسیدهای آنتی‌اکسیدان و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که پروتئین هیدرولیز شده *Cajanus cajan* منبع مناسبی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان و تغذیه‌ای است.

منابع

Adebowale, K. O., Lawal, O. S. 2004. Comparative study of the functional properties of bambarra groundnut (*Voandzeia subterranean*), jack bean (*Canavaliaensiformis*) and mucuna bean (*Mucunapruriens*) flour. Food Research International, 37:355-365.

Akintayo, E.T., Oshodi, K.O. & Esuoso, K.O., 1999, Effects of NaCl, ionic strength and pH on the foaming and gelation of pigeon pea (*Cajanus cajan*) protein concentrates. *Food Chemistry* 66: 51-56.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 2005, Official methods of analysis. 18th ed. Washington, DC.

Castro, R.J. S. & Sato, H.H., 2015, A response surface approach on optimization of hydrolysis parameters for the production of egg white protein hydrolysates with antioxidant activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology***,** 4(1): 55-62.

Chi, C.F., Hu, F.Y., Wang, B., Li, T. & Ding, G.F., 2015, Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (*Tegillarca granosa*) muscle. *Journal of Functional Foods*, 15: 301-313.

FAO, 2011, Dietary protein quality evaluation in human nutrition. Report of an FAO Expert Consultation Auckland, New Zealand, 31 March–2 April.

Farvin, K.H.S., Andersen, L.L., Nielsen, H.H., Jacobsen, C., Jakobsen, G., Johansson, I. & Jessen, F., 2014, Antioxidant activity of Cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: In vitro assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion. *Food Chemistry*, 149: 326-334.

Garcia-Moreno, P.J., Guadix, A., Guadix, E.M. & Jacobsen, C., 2016, Physical and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions stabilized with fish protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 203: 124-135.

Ghnimi, S., Budilarto, E. & Kamal-Eldin, A. 2017, the New Paradigm for Lipid Oxidation and Insights to Microencapsulation of Omega-3 Fatty Acids. *Comprehensive Reviewsin Food Science and Food Safety*, 16: 1206-1216.

Gringer, N., Safafar, H., Mesnildot, A., Nielsen, H.H., Rogowska-Wrezesinska, A., Undeland, I. & Baron, C.P. (2016) Antioxidative low molecular weight compounds in marinated herring (*Clupea harengus*) salt brine. *Food Chemistry*, 194: 1164-1171.

Halim, N.R.A. & Sarbon, N.M. 2017. A response surface approach on hydrolysis condition of eel (*Monopterus* Sp.) protein hydrolysate with antioxidant activity. *International Food Research Journal*, 24(3): 1081-1093.

Jeewanthi, R. K. C., Lee, N. & Paik, H., 2015, Improved Functional Characteristics of Whey Protein Hydrolysates in Food Industry. *Korean Journal of Food Science and Animal Resources*, 35(3): 350-359.

Jurado, E., Vicaria, J.M., Lechunga, M. & Moya-Ramirez, I., 2012, Pepsin extraction process from swine wastes. Procedia Engineering, 42: 1346- 1350.

Khairul Anwar, M.S. & Mohamed Afizal, M.A., 2015, Overview on the Response Surface Methodology (RSM) in Extraction Processes. *Journal of Applied Science & Process Engineering*, 2(1): 8- 17.

Kinsella, J. E., 1976, Functional properties of proteins in foods: A survey. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 7: 219-280.

Kumar, N.S.S., Nazeer, R.A. & Jaiganesh, R., 2011, Purification and biochemical characterization of antioxidant peptide from horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) viscera protein. *Peptides* 32: 1496-1501.

Lacroix, I.M., Chen, X.-M., Kitts, D. & Li-Chan, E.C., 2017, Investigation into the bioavailability of milk protein-derived peptides with dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity using Caco-2 cell monolayers. *Food and Function*. 2017, 8, 701–709.

Li, B., Qiao, L., Li, L., Zhang, Y., Li, K., Wang, L. & Qiao, Y., 2017, A novel antihypertensive derived from Adlay (Coix larchryma-jobi L. Var. ma-yuen Stapf) *Glutelin. Molecules*, 22(1): 123.

Meshginfar N, Sadeghi-Mahoonak, A., Ziaiifar, A.M., Ghorbani, M. & Kashaninejad, M., 2014, Study of antioxidant activity of sheep visceral protein hydrolysate: Optimization using response surface methodology. ARYA *Atherosclerosis*, 10(4): 179-84.

Ng, K.L., Ayob, M.K., Said, M., Osman, M.A. & Ismail, A., 2013, Optimization of enzymatic hydrolysis of palm kernel cake protein (PKCP) for producing hydrolysates with antiradical capacity. *Industrial Crops and Products*, 43: 725-731.

Nix, A., Paull, C.A. & Colgrave, M., 2015, The flavonoid profile of pigeonpea, Cajanus cajan: a review. *SpringerPlus*, 4(1):125.

Nourmohammadi, E., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Alami, M. & Sadeghi, M. 2017. Identification of the optimum conditions to anti-oxidative peptides production through the enzymatic hydrolysis of pumpkin oil cake protein by pepsin. *Journal of Food Science and Technology*. 61(13): 135- 142.

Olagunju, A.I., Omoba, O.S., Enujiugha, V.N., Alashi, A.M. & Aluko, R.O. 2018. Antioxidant properties, ACE/renin inhibitory activities of pigeon pea hydrolysates and effects on systolic blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Food Science and Nutrition*. 6:1879–1889.

Ovissipour, M., Abedian-Kenari, A., Motamedzadegan, A. & Nazari, R.M., 2010, Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Visceral Waste Proteins of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*). *Food Bioprocess and Technology*, 5(2): 696-705.

Park, S.Y., Kim, Y.S., Ahn, C.B. & Je, J.Y., 2016, Partial purification and identification of three antioxidant peptides with hepatoprotective effects from blue mussel (*Mytilus edulis*) hydrolysate by peptic hydrolysis. *Journal of Functional Foods*, 20: 88–95.

Pereira D, Simionatto Pinheiro R, Fernanda Serafini Heldt L et al 2017. Rosemary as natural antioxidant to prevent oxidation in chicken burgers. *Food Science and Technology*, 37(1): 17-23.

Queiroz, A.L.M., Bezerra, T.K.A., Pereira, S.F., Silva, M.E.C., Gadelha, C.A.A., Gadelha, T.S., Pacheco, M.T.B. & Madruga, M.S., 2017, Functional Protein Hydrolysate From Goat By-Products: Optimization And Characterization Studies. *Food Bioscience*, 20: 19- 27.

Raftani-Amiri, Z., Safari, R., Bakhshande, T. & Ahmadi-Vavsari, F., 2016, Functional properties of fish protein hydrolysates from Cuttlefish (*Sepia pharaonis*) muscle produced by two commercial enzymes. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 15 (4): 1485-1499.

Rakte, A.S. & Nanjwade, B.K., 2014, Proteolytic Enzymes Delivery Systems: A Review. *International Journal for Pharmaceutical Research Scholars* (IJPRS), 3(2): 188- 197.

Saxena, K.B., Ravikoti, V.K. and Sultana, R. 2010. Quality nutrition through pigeonpea—a review. HEALTH 2, 1335-1344.

Sarmadi, B. H. & Ismail, A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. Peptides. 31:1949–1956.

Silpradit, K., Tadakittasaren, S., Rimkeeree, H., Winitchai, S & Haruthanasan, V. 2010. Optimization of rice bran protein hydrolysate production using alcalase. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 3(02): 221- 231.

Solomon, S.G., Okomoda, V.D. & Onah, R.E., 2016, Nutritional profile of soaked Cajanus cajan (L.) Millsp. and its utilization as partial replacement for soybean meal in the diet of Clarias gariepinus (Burchell, 1822) fingerlings. *Journal of Applied Ichthyology* 33(3): 450-457.

Umayaparvathi, S., Meenakshi, S., Vimalraj, V. & Arumugam, M., 2014, Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*). *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4: 343-353.

Yildirim, A., Mavi, A.& Kara, A.A., 2001, Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* extracts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49:4083–4089.

Yu, H.C. & Tan, F.J., 2017, Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis conditions for the production of antioxidant hydrolysates from porcine liver by using response surface methodology. *Asian- Australasian Journal of Animal Sciences*, 30 (11): 1612-1619.

Zheng, Y., Li, Y., Zhang, Y., Ruan, X. & Zhang, R., 2017, Purification, characterization, synthesis, in vitro ACE inhibition and in vivo antihypertensive activity of bioactive peptides derived from oil palm kernel glutelin-2 hydrolysates. . *Journal of Functional Foods* 28: 48-58.

Zou, T.B., He, T.P., Li, H.B., Tang, H.W. & Xia, E.Q., 2016, the Structure-Activity Relationship of the Antioxidant Peptides from Natural Proteins. *Molecules*, 21(1): 72.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 15, No. 5, Dec- Jan 2020, p. 583-596

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 15، شماره 5، آذر - دی 1398، ص.596-583

Optimization of *Cajanus Cajan*'s antioxidant and nutritional characteristics during hydrolysis process by pepsin using response surface method

E. Ranjbar Nadamani[1], A. R. Sadeghi Mahoonak[2], M. Ghorbani[2], Sh. Jakobson[3], V. Khori[4]

Received: 2018.12.05
Accepted: 2019.05.01

Introduction: Proteins are being hydrolyzed to generate various properties such as antioxidant activity and nutritional values. Enzymatic hydrolysis is carried out in milder condition and is more controllable. The produced protein hydrolysates' properties are dependent to the hydrolysis condition. So by optimizing the hydrolysis conditions, proteins with higher antioxidant abilities are achieved. Response surface method is a statistical way to optimize and model the process more efficiently. The aim of present study was to optimize and model the hydrolysis condition to produce and antioxidant protein hydrolysate with high nutritional value from *Cajanus cajan* by pepsin.

Materials and methods: First, Cajanus cajan's proteins solubility was measured. After reaching the pHs with the most and least solubility, protein extraction was carries out by using NaOH and HCl. Enzyme concentration (1, 2, 3%), temperature (30, 35, 40 °C) and time (2, 3.5, 5 h) as independent variables were given to the Design Expert software and protein hydrolysis was done in a shaker incubator according to the 20 treatments suggested by the software. 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity, hydroxyl radical scavenging activity, Reducing power and total antioxidant activity were measured as dependent variables. Antioxidant assays were modeled by the software and the optimum condition was evaluated. The obtained optimum condition was validated by repeating the antioxidant assays for the protein hydrolysate produced in the optimum condition. The amino acid profile of the protein hydrolysate was measured using HPLC-MS and chemical score was measures. Then, the molecular weight distribution of the protein concentrate and protein hydrolysate was evaluated by FPLC. Chemical composition of the samples was also measured.

Results & discussion: The optimum condition for achieving antioxidant protein hydrolysate was enzyme concentration 2.15%, temperature 39.99 °C and time 4.52 h. Model validation results for this point were including DPPH scavenging activity 58.49%, reducing power 0.31 nm, hydroxyl radical scavenging activity 38.2% and total antioxidant capacity 0.63 nm. The protein concentrate consisted of 215.84 mg/g hydrophobic and 57.04 mg/g of them were aromatic amino acids. These amino acids are responsible for antioxidant activity of the protein hydrolysates. Chemical scores for essential amino acids were good. Most of the peptides in the protein hydrolysate had molecular weights below 10 kD that is considered to have antioxidant activities. Hydrolysis also increased the protein and ash content while fat and water content decreased compared to the *Cajanus cajan*'s flour and protein concentrate. Results showed that *Cajanus cajan*'s protein hydrolysate can be a good source of antioxidants and play a positive role in human nutrition.

Keywords: Protein hydrolysate, Pepsin, Antioxidant, Pea, Bioactive peptide

1.PhD. Student, Department of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran.
2.Associate professor, Department of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran.
3. Professor, Division of Industrial Food Research, Technical University of Denmark, Copenhagen, Denmark.
4. Professor of Pharmacology, Department of Pharmacology, School of Medicine, Ischemic Disorders Research Center, Golestan University of Medical Sciences.
(*Corresponding Author Email: sadeghiaz@yahoo.com)